

AGENT FOR SUPPRESSING PROLIFERATION OF SYNOVIOCYTE AND AGENT FOR TREATMENT OF RHEUMATOID ARTHRITIS

Publication number: JP7324035

Publication date: 1995-12-12

Inventor: HIGAKI MEGUMI; SAKANE TAKESHI; MIZUSHIMA YUTAKA; YASUMOTO TAKASHI; MORISAWA YOSHITOMI

Applicant: L T T KENKYUSHO KK

Classification:

- international: C07H19/213; A61K31/70; A61K31/7042; A61K31/7052; A61K31/7076; A61P43/00; C07H19/00; A61K31/70; A61K31/7042; A61P43/00; (IPC1-7): A61K31/70; A61K31/70; C07H19/213

- european:

Application number: JP19940116194 19940530

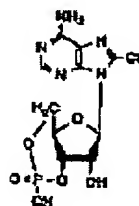
Priority number(s): JP19940116194 19940530

Report a data error here

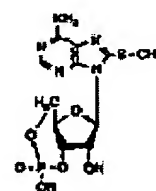
Abstract of JP7324035

PURPOSE: To provide an effective and safe agent effective for suppressing the proliferation of synovioocyte and composed of a specific cAMP derivative and provide an agent for the treatment of rheumatoid arthritis containing the proliferation suppressing agent.

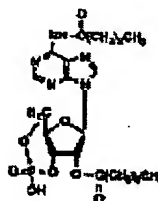
CONSTITUTION: This synovioocyte-proliferation suppressing agent is composed of one or more compounds selected from cAMP derivatives such as cAMP halogenated or thioesterified at 8-site or having acylated or alkylated 2'-OH group and/or N<6> site, e.g. 8-chloro-cAMP of formula I, 8-bromo-cAMP, 8-thiomethyl-cAMP of formula II, N<6>,2'-O-dibutyl-cAMP of formula III, N<6>-monobutyl-2'-deoxy-cAMP of formula IV and N<6>-benzyl-cAMP of formula V. Among the exemplified compounds, 8-bromo-cAMP and 8-chloro-cAMP act at low concentration and especially the former compound is preferable to specifically suppress the proliferation of human synovioocyte. In the case of using the compound as an agent for the treatment of rheumatoid arthritis, the cAMP derivative is administered at a daily rate of 0.125-25μg, especially 1-5μg for adult preferably in 1-3 divided doses.



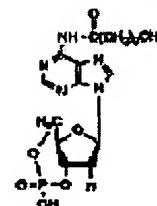
I



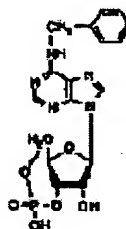
II



III



IV



V

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-324035

(43)公開日 平成7年(1995)12月12日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 31/70	AAG			
	ABJ			
	AED			
C 0 7 H 19/213				

審査請求 未請求 請求項の数3 O L (全 7 頁)

(21)出願番号 特願平6-116194

(22)出願日 平成6年(1994)5月30日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成6年4月28日
日本リウマチ学会主催の「第38回日本リウマチ学会総
会」において文書をもって発表

(71)出願人 391043055

株式会社エルティーター研究所
神奈川県川崎市宮前区菅生2-16-1

(72)発明者 桧垣 恵

神奈川県川崎市宮前区有馬4-2-24-
305

(72)発明者 坂根 剛

神奈川県川崎市麻生区王禅寺747番地24号

(72)発明者 水島 裕

東京都世田谷区梅ヶ丘1丁目1番11号

(74)代理人 弁理士 遠山 勉 (外2名)

最終頁に続く

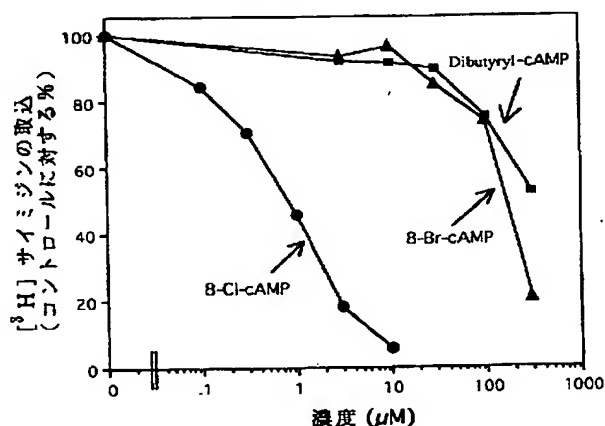
(54)【発明の名称】 滑膜細胞増殖抑制剤及び慢性関節リウマチ治療剤

(57)【要約】

【目的】 有効かつ安全な滑膜細胞増殖抑制剤及び慢性
関節リウマチの治療剤を提供する。

【構成】 8-クロロ-cAMP、8-ブromo-cAMP、N⁶, 2'-O-ジブチリル-cAMP、2-n-
ブチル-8-ブromo-cAMP、2'-O-モノブチリ
ル-cAMP、N⁶-モノブチリル-2'-デオキシ
cAMP、2'-O-モノブチリル-8-ブromo-cA
MP、N⁶-ベンジル-cAMP、8-チオメチル-c
AMP、Rp-8-クロロ-cAMP S、Sp-8-ブ
romo-cAMP S、N⁶, 2'-O-ジブチリル-cA
MP、N⁶-フェニル-8-p-クロロフェニルチオ
cAMP等のcAMP誘導体からなる滑膜細胞増殖抑制
剤を慢性関節リウマチ治療剤の有効成分とする。

cAMP誘導体による用量依存的な滑膜細胞の増殖抑制
(RA患者5)



【特許請求の範囲】

【請求項1】 cAMP誘導体から選ばれる1種または2種以上からなる滑膜細胞増殖抑制剤。

【請求項2】 前記cAMP誘導体は、8-クロロ-cAMP、8-ブロモ-cAMP、N⁶, 2'-O-ジブチリル-cAMP、2-n-ブチル-8-ブロモ-cAMP、2'-O-モノブチリル-cAMP、N⁶-モノブチリル-2'-デオキシ-cAMP、2'-O-モノブチリル-8-ブロモ-cAMP、N⁶-ベンジル-cAMP、8-チオメチル-cAMP、Rp-8-クロロ-cAMPs、Sp-8-ブロモ-cAMPs、N⁶, 2'-O-ジブチリル-cAMP、N⁶-フェニル-8-p-クロロフェニルチオ-cAMPから選ばれることを特徴とする請求項1記載の滑膜細胞増殖抑制剤。

【請求項3】 請求項1または2記載の滑膜細胞増殖抑制剤を有効成分として含有する慢性関節リウマチ治療剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、滑膜細胞増殖抑制剤及び慢性関節リウマチ治療剤に関する。

【0002】

【従来の技術】慢性関節リウマチ(rheumatoid arthritis)は関節滑膜を炎症の主座とし、軟骨や骨の破壊を引き起こす原因不明の慢性疾患である。慢性関節リウマチの滑膜組織には、リンパ球浸潤、血管新生と共に滑膜細胞の増殖を伴う滑膜表層の重層化が認められる。軟骨、骨に浸潤するパニヌスと呼ばれる肉芽組織では、マクロファージ様のA型滑膜細胞と共に線維芽細胞様のB型滑膜細胞の増殖が著明である。B型滑膜細胞の増殖は炎症滑膜局所で検出されるインターロイキン1や血小板由来増殖因子などのモノカインによって引き起こされ、増殖・活性化した滑膜細胞の産生するサイトカインやマトロプロテアーゼ、プロスタグランディンにより軟骨・骨破壊が引き起こされる。以上の知見から、滑膜細胞の増殖を阻害できれば、慢性関節リウマチの治療が可能になると考えられるが、滑膜細胞の増殖を抑制する物質は殆ど知られておらず、実用的な使用は行なわれていない。

【0003】ところで、サイクリックAMP(cAMP)は、細胞内に情報を伝達するセカンドメッセンジャーとして、cAMP依存性蛋白質リン酸化酵素(Aキナーゼ)を活性化することにより、心臓における心拍数の増大及び収縮力の増強、脂肪細胞における脂肪分解の促進、膵臓B細胞におけるインスリン分泌の促進、胃壁細胞における胃酸分泌の促進、肝臓におけるグリコーゲン分解の促進、甲状腺や副腎皮質におけるホルモン分泌の促進など様々な生理応答を引き起こす。Aキナーゼは、さらに細胞増殖にも関与していることが知られている。近年、Aキナーゼの2種類の調節サブユニットRI及びRI

細胞の分化と増殖へのベクトルが決定され、一部の腫瘍細胞ではRIサブユニットの優位により増殖が亢進していることが明らかになった。(Proc Natl Acad Sci 88:2011-2015, 1991)。さらに、種々の細胞膜透過型のcAMPアナログが合成されるなかで、8-Cl-cAMPはRIIサブユニットに対する親和性が高く、キナーゼ活性化作用が弱く、腫瘍治療としての開発も行なわれている(Life Sciences 48:1123-1132, 1991)。しかし、このようなcAMP誘導体が慢性関節リウマチ滑膜細胞に対してどのような作用を有するかについては知られていない。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】上記のように、現状では慢性関節リウマチの実用的な治療方法は知られておらず、有効な治療薬が望まれている。本発明は、かかる観点からなされたものであり、有効かつ安全な滑膜細胞増殖抑制剤及び慢性関節リウマチの治療剤を提供することを課題とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者は、上記課題を解決するために鋭意研究を行なった結果、cAMP誘導体が滑膜細胞の増殖を抑制する作用を有する事を見だし、本発明に至った。

【0006】すなわち本発明は、cAMP誘導体から選ばれる1種または2種以上からなる滑膜細胞増殖抑制剤、及びこの滑膜細胞増殖抑制剤を有効成分として含有する慢性関節リウマチ治療剤である。

【0007】以下、本発明を詳細に説明する。

【0008】<1>滑膜細胞増殖抑制剤

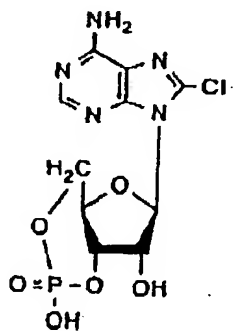
本発明の滑膜細胞増殖抑制剤は、cAMP誘導体からなり、単独でも任意の2種以上の混合物でもよい。本発明に用いられるcAMP誘導体は、軟骨や骨の破壊を引き起こす要因となる滑膜細胞の増殖を抑制する効果を有する。このようなcAMP誘導体としては、cAMPの8位がハロゲン化あるいはチオエステル化されたもの、2'位の水酸基及び/又はN⁶位がアシル化またはアルキル化されたもの等が挙げられる。具体的には、例えば、下記式で表される8-クロロ-cAMP(化1:以下、「8-Cl-cAMP」という)、8-ブロモ-cAMP(化2:以下、「8-Br-cAMP」という)、N⁶, 2'-O-ジブチリル-cAMP(化3:以下、「Dibutryl-cAMP」という)、2-n-ブチル-8-ブロモ-cAMP(化4)、2'-O-モノブチリル-cAMP(化5)、N⁶-モノブチリル-2'-デオキシ-cAMP(化6)、2'-O-モノブチリル-8-ブロモ-cAMP(化7)、N⁶-ベンジル-cAMP(化8)、8-チオメチル-cAMP(化9)、Rp-8-クロロ-cAMPs(化10)、Sp-8-ブロモ-cAMPs(化11)、N⁶-フェニル-8-p-クロロフェニルチオ-cAMP(化12)等が挙げられる。これらの中では、8-Br-cAMP及び8-Cl-cAMPは低濃度で作用し、特に

3

8-Br-cAMPはヒト滑膜細胞に特異的に増殖を抑制する点で好ましい。また、cAMP誘導体の薬理学上許容される塩、例えば、Na塩、アンモニウム塩等も同様に本発明に使用することができる。

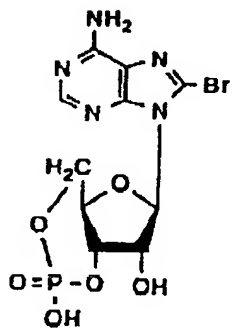
【0009】

【化1】



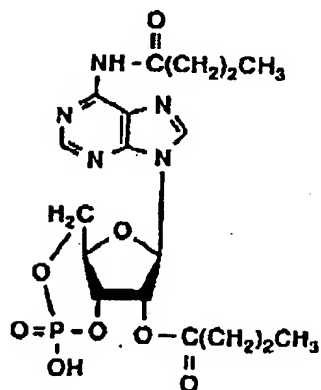
【0010】

【化2】



【0011】

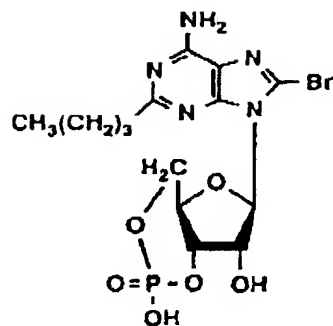
【化3】



【0012】

【化4】

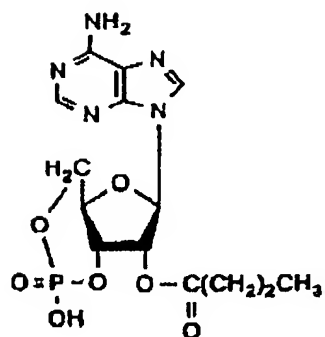
4



10

【0013】

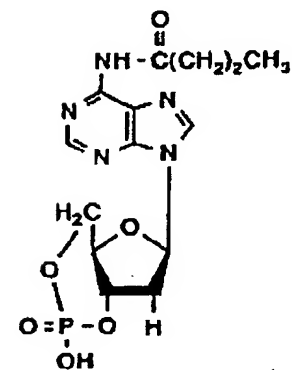
【化5】



20

【0014】

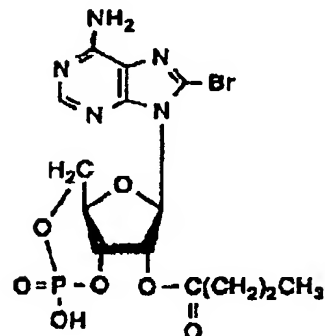
【化6】



30

【0015】

【化7】

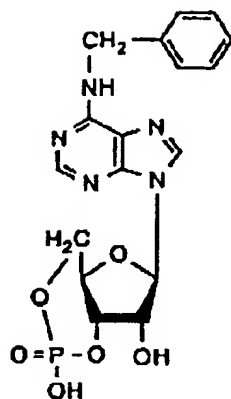


40

5

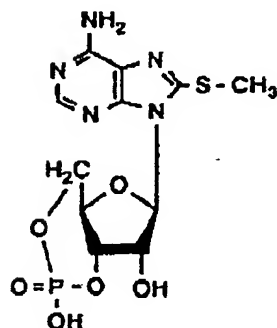
【0016】

【化8】



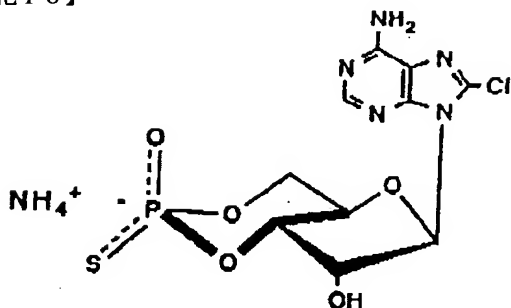
【0017】

【化9】



【0018】

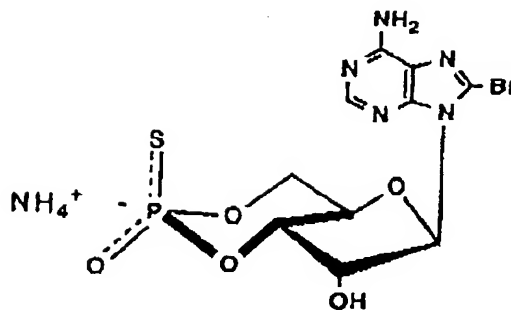
【化10】



【0019】

【化11】

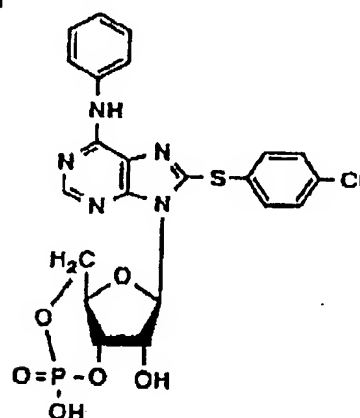
6



10

【0020】

【化12】



20

【0021】cAMP誘導体は、cAMPを基に化学合成が可能であり、また、8-Br-cAMP、8-Cl-cAMP、Dibutyl-ryl-cAMP、8-クロロ-cAMP (8-Cl-cAMP)、8-ブプロモ-cAMP (8-Br-cAMP)、N⁶, 2'-O-ジブチリル-cAMP (Dibutyl-ryl-cAMP)、2'-O-モノブチリル-cAMP、N⁶-モノブチリル-2'-デオキシ-cAMP、2'-O-モノブチリル-8-ブプロモ-cAMP、N⁶, 2'-O-ジブチリル-cAMP等は市販されており（例えばシグマ社）、それらを使用してもよい。

30

【0022】＜2＞慢性関節リウマチ治療剤

本発明の慢性関節リウマチ治療剤は、上記滑膜細胞増殖抑制剤を有効成分として含有し、cAMP誘導体の持つ滑膜細胞増殖抑制作用に基づいて慢性関節リウマチを治療する効果を奏するものである。本発明の治療剤は、滑膜細胞増殖抑制剤以外に、薬剤学的に許容される担体を基剤として用いてもよい。担体としては、具体的には、結晶性セルロース、ゼラチン、乳糖、澱粉、植物性及び動物性脂肪及び油、ガム、ポリアルキレングリコール等が挙げられる。この場合、製剤全量に対するcAMP誘導体の配合料は特に限定されないが、通常10⁻⁴～10⁻⁷重量%が好ましい。

40

【0023】また、本発明の治療剤は、経口、経腸または経静脈及び関節腔内注入のような局所投与による製剤のいずれの製剤にも適用できる。具体的剤型としては、

50

錠剤、カプセル剤、細粒剤、シロップ剤、坐薬、軟膏剤、注射剤等が挙げられる。

【0024】さらに、本発明の慢性関節リウマチ治療剤は、cAMP誘導体以外の成分であって製剤に混和できるもの、例えばデンプン、マンニトール、乳糖などの賦形剤、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ヒドロキシプロピルセルロース等の結合剤、結晶セルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム等の滑沢剤、軽質無水ケイ酸等の流動性向上剤等を適宜組み合わせることでよい。

【0025】本発明の治療剤の投与量は特に限定されない(組成)

8-Br-cAMP	10 μg
乳糖	140 g
結晶セルロース	25 g
トウモロコシ澱粉	25 g
3%ヒドロキシプロピルセルロース水溶液	100 mL
ステアリン酸マグネシウム	2 g

【0028】(製法) cAMP誘導体に、乳糖、結晶セルロース及びトウモロコシ澱粉を60メッシュのふるいで篩過し、均一に混合した後、練合機に投入し、3%ヒドロキシプロピルセルロース水溶液を注加して練合する。ついで、16メッシュのふるいで造粒し、50度で送風乾燥する。乾燥後、16メッシュのふるいを通して整粒を行ない、ステアリン酸マグネシウムを混合し、打錠機で重量約200mgの錠剤にする。

【0029】

【製造例2】 カプセル剤
(組成)

8-Cl-cAMP	5 μg
乳糖	148 g
コーンスターチ	50 g
ステアリン酸マグネシウム	1.5 g

【0030】(製法) 上記成分を細かく粉末にし、均一な混合物になるように十分攪拌した後、これを0.2gづつゼラチンカプセルに充填し、カプセル剤とする。

【0031】

【製造例3】 水性懸濁液
(組成)

Rp-8-プロモ-cAMPS	1 μg
カルボキシメチルセルロースナトリウム	35 mg
ポリソルベート80	25 mg
ベンジルアルコール	70 mg
注射用精製水 (全体として)	100 mL

【0032】(製法) 上記成分を半量の注射用精製水に攪拌しながら加え、十分攪拌した後、残りの半量の注射用精製水を加えて再び懸濁する。約1時間攪拌後、1mLの容量に充填し、関節注入用の水性懸濁液とする。

【0033】<本発明の滑膜細胞増殖抑制剤の評価>慢性関節リウマチ患者5人(RA患者1~5)及び変形関

いが、通常はcAMP誘導体の量として、成人一日当たり0.125~25 μg以上であり、好ましくは1~5 μgである。この範囲で使用することにより、所期の効果が期待でき、上記範囲の量を一日1~3回に分けて投与するのが好ましい。また、関節腔内注入剤は、水性懸濁注射液として用い、投与間隔は2~4週間とするのが好ましい。

【0026】

【実施例】以下に本発明の実施例を説明する。

【0027】

【製造例1】 錠剤

節症患者1人(OA患者)について膝関節置換術時に得られた生検滑膜より付着滑膜細胞を調製し、この細胞を用いて本発明の滑膜細胞増殖抑制剤の評価を行なった。

【0034】(1) 使用した細胞

滑膜細胞は次のようにして調製した。TKR(Total knee replacement)手術によって得た患者の膝関節滑膜の脂肪部を除去し、組織を細切し、組織分解酵素ディスペール(Dispersol: collagenase/DNase, IBL社)で、37℃2時間酵素処理を行なって滑膜組織を分散した。分差した組織をメッシュ(#50 mesh)に通して単一細胞に単離したのちRPMI 1640培地で洗浄した。得られた細胞懸濁液をフィコール(ナカライ社)を用いた濃度勾配に重層、遠心分離することにより単核球画分を得、これを再び洗浄した後、20%ウシ胎児血清、100 μg/mLペニシリン、100 U/mLストレプトマイシン、及び100 μM L-グルタミンを含むRPMI 1640培地に4×10⁵/mLになるように懸濁した。一方、コントロールとしてはヒト線維芽細胞のWI 38細胞、ヒト前骨髄性白血病細胞のHL-60、ウサギ滑膜細胞のHi g 82細胞を用いた。

【0035】(2) 滑膜細胞に対するcAMP誘導体の影響

数代継代した滑膜細胞を無血清培地(1%ITS(コラボレイティブ社製)添加RPMI 1640培地)に2.5×10⁴/mLになるように懸濁し、96ウェルプレートに100 μLづつ播種した。48時間後に20%FCS含有培地に交換して同時に10⁻⁶~10⁻³ Mの種々の濃度の8-Cl-cAMP、8-Br-cAMP、あるいはDibutyryl-cAMPを添加した。

【0036】48時間後に1 μCi/ウェルの³H-サイミジン(比活性70 Ci/mM)を加え、16時間後に細胞に取り込まれた³Hの放射活性を液体シ

ンチレーションカウンターで測定した。なお、培養液中に浮遊細胞は殆ど認められず、トリパンブルー染色によっても細胞が死滅していないことが確認された。また、E L I S A (Enzyme-Immunosorbent assay) で測定したプロテアーゼインヒビターの産生には変化は認められなかった。

【0037】図1に、RA患者5について、各種濃度の各種細胞における50%増殖抑制濃度 (I C₅₀)

cAMP誘導体を添加した時の滑膜細胞のサイミジンの取り込みの用量依存的变化を示す(無添加の時を100%とする)。表1に、種々の細胞における [³H]-サイミジン取り込みが50%になる50%増殖阻害濃度 (I C₅₀) を示す。

【0038】

【表1】

細胞の種類	I C ₅₀ (μM)		
	8-Cl-cAMP	8-Br-cAMP	Dibutyl-cAMP
RA患者1	13	48	130
RA患者2	13	30	210
RA患者3	10	18	ND
RA患者4	3.4	64	280
RA患者5	2.5	160	300
OA患者	12	25	177
WI38	18	>300	ND
HL-60	12	260	ND
Hig82	70	160	>300

【0039】以上の結果から8-Cl-cAMP、8-Br-cAMP及びDibutyl-cAMPは、ヒト滑膜細胞の増殖に対して抑制作用があることが明らかになった。また、8-Cl-cAMP及び8-Br-cAMPは低濃度で作用を示した。

【0040】

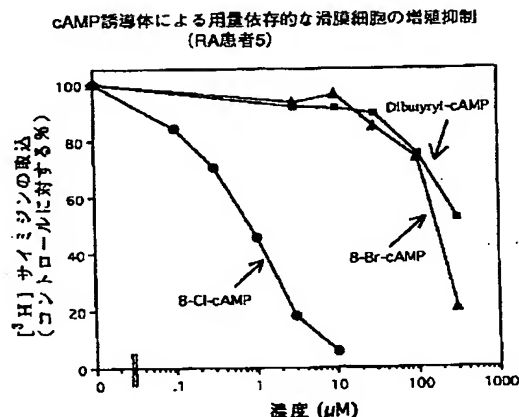
【発明の効果】本発明の滑膜細胞増殖抑制剤は、滑膜細

胞に増殖抑制効果を有するので、これを含有する慢性関節リウマチ治療剤は、慢性関節リウマチの治療に有効であると期待される。

【図面の簡単な説明】

【図1】cAMP誘導体による用量依存的な滑膜細胞の増殖抑制を示す図。

【図1】



(7)

特開平7-324035

フロントページの続き

(72)発明者 安本 隆志
神奈川県川崎市川崎区中島2-2-16-
302

(72)発明者 森澤 義富
神奈川県横浜市神奈川区羽沢町1150